

# Phospholipase 類による生体膜の分解に関する 研究 (第1報) Phospholipase C による ラット肝粗面ミクロソームの分解<sup>\*)</sup>

須 藤 誠 一

(山形大学農学部生物化学研究室)  
(昭和59年9月1日受理)

Studies on the Degradation of Biomembranes by Phospholipases.  
I. Degradation of Rat Liver Rough Microsomes  
by Phospholipase C.

Seiichi SUTO

Laboratory of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture,  
Yamagata University, Tsuruoka, Japan  
(Received September 1, 1984)

## 緒 言

生体膜は脂質二重層に蛋白質が結合したり, 埋めこまれたりしている基本構造を有する<sup>1)2)</sup>. 脂質は大部分 PL よりなるので, 膜酵素の脂質要求性や膜二重層への蛋白質や脂質の分布の研究など生体膜の研究に PLase が用いられている<sup>3)4)5)</sup>. PLase で膜の PL を分解すると膜の全体がどのような変化を示すかを検索するとともに, PLase 処理した膜を分離して詳細に解析すれば, 膜の micro-compartmentation や微細構造の解明が可能であると考えられる. 本研究では比較的簡単に多量に採取できるラット肝臓の内膜系の Ms を用いて, PLase による分解様式を解析する.

肝細胞内膜系に PLase 類を作用させる場合, ほとんどの実験で哺乳動物の体温である 37℃ で作用させているが, ラット肝 Ms を 20℃ 以上に incubate すると ribosome の凝集のおこることが報告されている<sup>6)</sup>. また, ラット肝 Ms の PL の相転移温度は 20℃ 以上と考えられる<sup>7)8)</sup>. 今回の実験では相転移温度以下の 19℃ で PLase 処理をおこなった. Incubation 中にも ribosome の遊離がおこるならば, stripped vesicle の生成が予想されたので, 膜の材料として rMs を用いた. 作用させる PLase として, PL を DG と水溶性のリン酸化アルコール類に分解する PLase C [EC 3. 1. 4. 3] を用いた.

---

略号, Chol : cholesterol, DG : diglyceride, GlcUase :  $\beta$ -glucuronidase, G6Pase : glucose-6-phosphatase, LPC : lysophosphatidyl-choline, M6Pase : mannose-6-phosphatase, Ms : microsome, NDPase : nucleoside diphosphatase, PC & PE & PI & PS : phosphatidyl-choline & ethanolamine & -inositol & -serine, PLase : phospholipase, rMs : rough microsome, Sph : sphingomyelin, TC : taurocholate, TCA : trichloroacetic acid.

<sup>\*)</sup> 本研究の一部は日本農芸化学会昭和57年度大会で発表した (要旨集, p. 526).

## 実験材料及び方法

### 1. rMs の調製

一夜絶食させたラット (どんりゅうらっと, オス, 150~180 g, 日本ラットKK) の肝臓をとり出し, 4倍容の 0.25 M sucrose と homogenize した. この homogenate を  $12,500\times g$ , 20分遠心してえた上清をさらに  $54,000\times g$ , 1時間遠心して Ms を沈澱させた. この Ms を 0.25 M sucrose に suspend し, その 4 ml を, 下から 2 M sucrose 1.5 ml, 1.3 M sucrose 4.5 ml を重層して作った不連続濃度勾配上に重層して, 日立65P超遠心機の RP 65 アングルローターで,  $264,000\times g$ , 2時間遠心した<sup>9)</sup>. 2 M sucrose 層と 1.3 M sucrose 層の界面上の浮遊物を採取し, 0.25 M sucrose で約5倍に希釈して sucrose 濃度を下げ, RP 30 ローターで  $77,500\times g$ , 1時間遠心して rMs を沈澱させた.

### 2. PLase C による rMs の処理

PLase C (*Clostridium perfringens*, 200 units/mg 蛋白質) は Sigma 社より購入した. rMs の PLase C 処理は 50 mM Tris buffer (pH 7.6), 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM Mg acetate を含む 0.25 M sucrose 1 ml 中に rMs 10 mg 蛋白質と PLase C 6 units を含む反応液組成で, 19℃, 30分間おこなった. 氷冷 0.25 M sucrose で希釈するとともに氷水中で冷却して反応を停止し, ただちに  $54,000\times g$ , 1時間遠心して処理 rMs を沈澱させた.

処理 rMs の細分画を次のようにおこなった. 処理 rMs を 0.25 M sucrose に suspend して, その 5 ml を 1.3 M sucrose 5 ml 上に重層し, RP 65 ローターで  $264,500\times g$ , 2時間遠心した. 1.3 M 層と 0.25 M 層の界面上の浮遊物 (F分画) と遠心管底の沈澱 (P分画) を採取し, それぞれを 0.25 M sucrose に分散して,  $77,500\times g$ , 1時間遠心して沈澱させた.

### 3. rMs 成分の定量

処理 rMs の蛋白質, PL, RNA の定量は Schmidt-Thannhauser<sup>10)</sup> および Schneider<sup>11)</sup> の方法を組合せて次のようにおこなった. 試料に氷冷下 TCA を添加して5%として rMs を沈澱させ, 沈澱を氷冷 6%  $\text{HClO}_4$  で2回洗浄した. 沈澱をエタノール・エーテル (1:1) 混液で50℃, 30分間抽出, さらに1度づつ混液とメタノールで洗浄, 抽出液と洗液を合して減圧乾涸し, Allen 法<sup>12)</sup>で全リン量を測定, その値を25倍して PL 量とした. 脂質抽出残渣を6%  $\text{HClO}_4$  に分散し, 75℃, 20分間抽出, さらに2回6%  $\text{HClO}_4$  で洗浄, 抽出液と洗液を合して定容し, Mejbaum のオルシノール法<sup>11)</sup>で RNA を定量した. RNA 抽出の残渣を 1 N NaOH 1 ml に懸濁, 75℃に5分間加熱して溶解し, ビューレット反応<sup>13)</sup>で蛋白質を定量した.

### 4. 酵素活性の測定

TC を添加した場合の活性 (全活性) の測定は次のようにおこなった<sup>14)</sup>. 1 ml 中約 2 mg に調整した処理 rMs suspension に, 8 mM Tris buffer (pH 7.6) に溶解した 4% TC を 1/9 容添加し, 氷冷下に30分以上放置したものを酵素液とし, 反応液には 1 ml 中 10 mg の牛血清アルブミンを添加した. TC 無添加の場合の活性測定では 0.25 M sucrose に suspend した処理 rMs を酵素液として用い, 反応液の sucrose 濃度を 0.25 M に調整し

た。

M6Pase および G6Pase——反応液 1 ml 中 rMs 約 1 mg, cacodylate buffer (pH 6.5) 50  $\mu$ mol, M6P 又は G6P 10  $\mu$ mol を含む反応液を19℃に10分間 incubate した。同容の 10% TCA を添加して反応を停止し、遊離する無機リンを Allen 法<sup>12)</sup>で測定した。

GlcUase——1 ml 中 rMs 約 1 mg, cacodylate buffer (pH 6.5) 50  $\mu$ mol, *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucuronide 5  $\mu$ mol とし、38℃で1時間 incubate した。0.02 M NaOH を 10 ml 添加して反応を停止し、410 nm での吸光度から、生成した *p*-nitrophenol を測定した<sup>15)</sup>。

NDPase——1 ml 中 rMs 約 1 mg, Tris buffer (pH 7.5) 50  $\mu$ mol, MgCl<sub>2</sub> 5  $\mu$ mol, uridine diphosphate 5  $\mu$ mol を含む反応液を19℃に10分間 incubate した。10% TCA 1 ml 添加して反応停止し、遊離した無機リンを Allen 法<sup>12)</sup>で測定した。<sup>16)17)</sup>

## 5. 脂質成分の定量

DG——Bligh-Dey 法<sup>18)</sup>で抽出した脂質からケイ酸カラムクロマトグラフィで DG 画分を分取し<sup>19)</sup>、ヒドロキサム酸法<sup>20)</sup>でエステル結合の  $\mu$ mol 量を測定、その 1/2 を DG 量とした。

Chol——試料を 5% TCA で沈澱し、エタノール・エーテル混液で抽出して、減圧下に乾涸したのち、メタノール性 0.3 N NaOH でケン化した。不ケン化物を石油エーテルで抽出し、Courchain 反応<sup>21)</sup>によって全 Chol を定量した。

PL 組成——Bligh・Dey 法<sup>18)</sup>で PL を抽出し、Skipski の方法<sup>22)</sup>で薄層クロマトグラフィをおこなって PL を分画した。各スポットをかきとり、その中の全 リン  $\mu$ mol 量を Bartlett 法<sup>23)</sup>で定量した。各 rMs 分画の PL 組成はクロマトグラム上の全スポットのリン量の合計に対する各スポットのリン量の割合として表示した。

## 6. 電子顕微鏡による形態検索

試料をブロック状で 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) 中 5% glutaraldehyde で固定、さらに 0.15 M buffer 中 1% OsO<sub>4</sub> で後固定した。常法にしたがってエタノールで脱水、metacrylate 包埋し、醋酸ウラニル及びクエン酸鉛で電子染色して撮影した<sup>24)</sup>。倍率は 40,000倍とした。

# 実 験 結 果

## 1. PLase C 処理による rMs 成分の変化

rMs は脂質二重層膜と内容物 (蛋白質など) 及び外層に結合する ribosome よりなるので、PLase で処理する場合などのように変化の大きい場合には、蛋白質、脂質、RNA を定

Table 1. Composition of the Major Components of the Treated rMs.

rMs	Protein	PL		RNA	
	mg	mg	mg/mg prot.	mg	mg/mg prot.
Untreated	8.87	4.33	0.49	1.97	0.22
Treated	7.63	1.47	0.19	1.79	0.23

量することによっておよそその構造変化を推定することができる。

rMs を19℃で PLase C 処理し、遠心して回収した処理 rMs の主要成分を定量した結果の1例を Table 1 に示す。PL は約 2/3 ないし 80% 程度減少するが、蛋白質と RNA には大きな減少がみられず、RNA/蛋白質比も変化しなかった。この結果は 37℃ incubation の結果<sup>25)</sup>と同様であって、rMs 内容物が溶出されないこと、ribosome の遊離がおこっていないことを示す。すなわち PLase C 処理は rMs 膜の崩壊をおこさないと考えられる。

## 2. Ms 膜内層所在酵素活性に及ぼす PLase C の影響

肝 Ms は G6P を水解するが、M6P は水解されない。しかし、界面活性剤などで Ms を破壊すると G6P のみでなく、M6P も水解されるようになる。Arion ら<sup>14)</sup>は Ms の G6Pase 系は Ms 膜の外層に存在する G6P translocase と内層に存在する nonspecific phosphatase とから構成されていて、G6P は translocase によって転移されて内層の phosphatase の作用を受けるが、M6P は translocase と反応しないので水解されないとした。しかし、Ms を破壊すると内層の phosphatase が露出されて M6P も水解されるようになる。したがって M6P 水解活性 (M6Pase) は内層の phosphatase の活性をあらわすことになり、Ms の M6Pase 活性が小さいほど (M6Pase の潜在性が大きいほど) Ms が無キズであることになる<sup>14)</sup>。他に NDPase と GlcUase も内層に存在することが知られているので<sup>3)</sup>、これらの酵素活性に及ぼす PLase C の影響を測定した。

Table 2 にみられるように、TC 未処理 rMs の M6Pase (0.66) は TC 処理で発現した全 M6Pase (4.22) の 16% であり、M6Pase の潜在性が 84% 保持されていたことを示す。PLase C 処理は M6Pase の TC 未処理活性には大きな影響を与えないが、全活性を 60% 阻害した。一方、TC 未処理 rMs の G6Pase (translocase) は PLase C 処理によって 80% 阻害され、TC 処理で発現した全活性は 70% 阻害された。GlcUase は TC 未処理活性も全活性も阻害を受けた。NDPase は TC 未処理活性も全活性も、上記 3 酵素とは逆に PLase C により活性化された。

以上、PLase C 処理は rMs 膜の崩壊はおこさないが、rMs 膜外層の酵素活性 (G6P translocase) のみならず、内層の酵素活性 (M6Pase など) に一定の影響を与えることが明らかになった。次にこの処理 rMs をさらに密度勾配遠心で細分画する実験をおこなった。

## 3. PLase C 処理 rMs の密度勾配細分画の成分

PLase C の作用で生成する DG など中性脂質は vesicle の密度を低下させると考えられ

Table 2. Effect of PLase C on the Luminal Enzyme Activities.

	PLase C	Enzyme Activities ( $\mu\text{mol}/\text{mg prot.}^*$ )	
		TC	
		—	Added
M6Pase	Untreated	0.66	4.22
	Treated	0.52	1.58
G6Pase	Untreated	2.66	4.40
	Treated	0.56	1.36
GlcUase	Untreated	0.39	0.49
	Treated	0.19	0.10
NDPase	Untreated	0.61	1.48
	Treated	0.84	1.81

\* Ms protein was determined by Lowry et al<sup>13)</sup>.

る。したがって、密度による vesicle の分別の可能性を検討するために、今回は rMs と sMs とを分画するのに用いた 1.3 M sucrose を用いて密度勾配遠心をおこなった。

Table 3 に主要成分の値を示す。PLase C 処理によって F 分画の蛋白質が若干増加し、PL は減少するが蛋白質当りの値は P 分画と同様であった。F 分画の RNA/蛋白質比は sMs に相当する値であった<sup>9)</sup>。なお、処理 rMs を 2 M sucrose 上に重層し、同様に遠心して遊離 ribosome の沈澱を試みたが、ごく微量で定量限界以下であった。すなわち P 分

Table 3. Composition of the Major Components of the Subfractions.

PLase C-Subfraction		Protein	PL		RNA	
		mg	mg	mg/mg prot.	mg	mg/mg prot.
Untreated	F	1.05	0.55	0.52	0.09	0.09
	P	7.95	3.53	0.44	1.95	0.25
Treated	F	1.70	0.29	0.17	0.13	0.08
	P	7.05	1.03	0.15	1.66	0.24

Table 4. Distribution of DG in the Treated rMs.

PLase C	DG ( $\mu$ mol/mg protein)		
	rMs	Subfraction	
		F	P
Untreated	0.014	0.024	0.009
Treated	0.172	0.277	0.138

Table 5. Distribution of Chol in the Treated rMs.

Chol	PLase C-Treated		
	rMs	Subfraction	
		F	P
$\mu$ mol	2.89	0.70	1.65
$\mu$ mol/mg prot.	0.04	0.05	0.03

画は遊離 ribosome や polysome をほとんど含んでいないと考えられる。

Table 4 に PLase C の反応生成物 DG の含有率を示す。F 分画の含有率が大きいですが、P 分画にも 1/2 程度含まれ、両分画の間に明確な質的差がみられなかった。

Chol は膜脂質の流動性や密度に影響を与えるが<sup>26)</sup>、Table 5 に示すように、Chol の含有率は F 分画の方が高いが、総量は P 分画の方に多く含まれていた。なお、PLase C 処理時及び F 分画を沈澱させるときの遠心上清中の 5% TCA 沈澱性 Chol は沈澱画分中の含量の 2% 以下であった。

#### 4. PLase C 処理による PL 組成の変化

Table 6 に処理 rMs 及びその細分画の

Table 6. Change of the PL Composition by PLase.

	PL Composition (%)			
	Untreated	Treated		
		rMs	Subfraction	
			F	P
Front*	2	6	9	4
PE	20	22	26	25
PS+PI	11	32	33	39
PC	59	30	24	27
Sph	5	5	4	3
LPC	4	5	4	3

Figures indicate the percentage of each PL species of the sum of PL's of individual rMs fraction.

\* The uppermost spot of the thin layer chromatogram.

PL 組成を示す. 未処理 rMs では PC がもっとも多く, PS+PI 画分は少量であるが, PLase C 処理によって, PS+PI 画分が最多の成分になり, PC は PS+PI 画分以下の割合にまで減少した. F 分画と P 分画との間には差がみられなかった.

### 5. PLase C 処理による rMs 形態の変化

Fig. 1 に (a) 未処理 rMs, (b) PLase C 処理 rMs, (c) 処理 rMs の F 分画, (d) P 分画の電子顕微鏡像を示す. rMs を PLase C 処理すると (b) にみられるように膨潤した大きな vesicle と electron dense な部分をもつ vesicle の生成が認められる. 処理 rMs の細分画では, (c) に示すように F 分画は膨潤した大きな vesicle と dense vesicle 及び少量の rough vesicle よりなり, (d) の P 分画は基本的に dense vesicle と rough vesicle よ

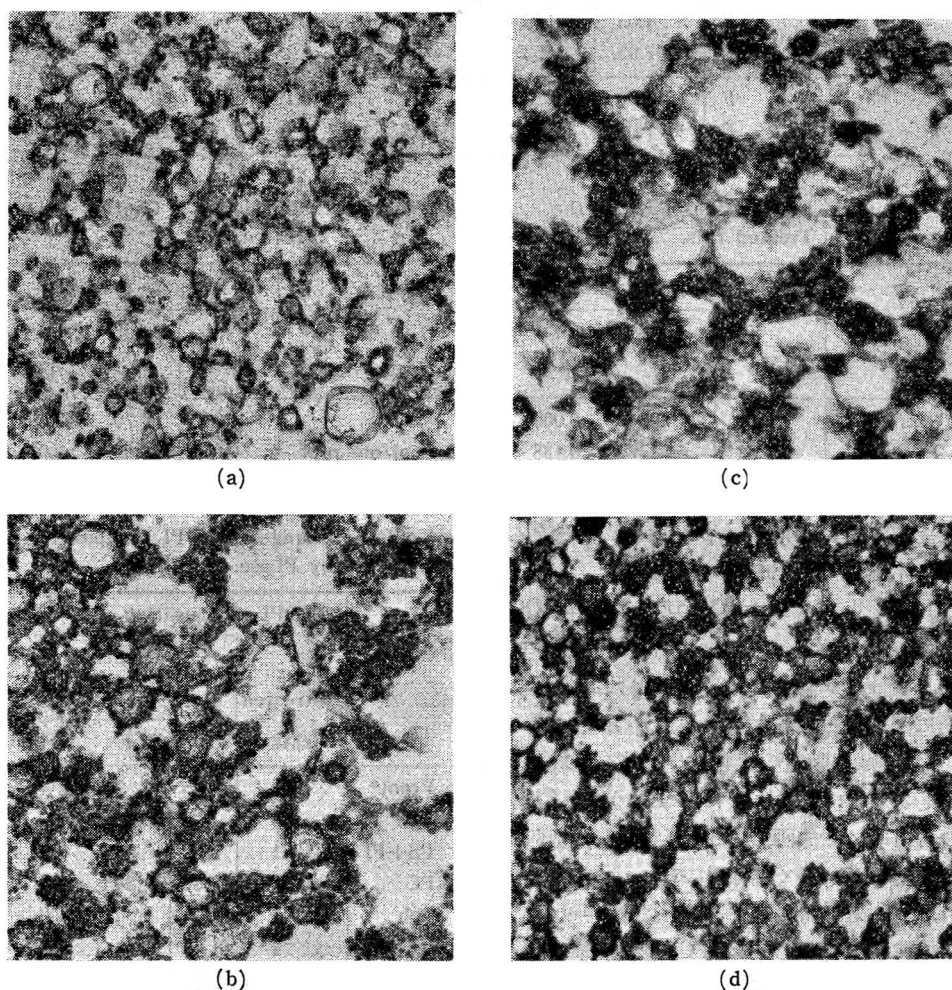


Fig. 1. Electron Micrographs of rMs and Subfractions.

- |                         |                                  |
|-------------------------|----------------------------------|
| (a) rMs                 | (c) Subfraction F of Treated rMs |
| (b) PLase C-treated rMs | (d) Subfraction P of Treated rMs |
- Magnification,  $\times 40,000$

りになっている。このような膨潤 vesicle と dense vesicle の生成は相転移温度より高温で PLase C 処理した場合<sup>27)</sup>と同じ結果である。

## 考 察

生体膜の脂質二重層は、相転移温度以上では液晶相で膜成分の移動性が大きい、以下ではゲル相で成分の動きが制限される<sup>28)</sup>。相転移温度以下の19℃で rMs を PLase C 処理した結果は、rMs 膜の崩壊をおこさず、ribosome を遊離しない (Table 1)、PL 組成では PC の割合が小さくなって PS-PI 画分の割合が最大になる (Table 6)、電子顕微鏡像では膨潤 vesicle と dense vesicle の生成がみられる (Fig. 1)、G6Pase が阻害される (Table 2) など、37℃での知見<sup>3)(4)(5)(29)</sup>と大きな差がなかった。

処理 rMs の 1.3 M sucrose 層の界面に浮遊する F 分画と遠心管底に沈澱する P 分画の成分の間では、RNA/蛋白質比が大きな差を示した以外に、PL 含量 (Table 3)、DG と Chol の含量 (Table 4 及び 5)、PL 組成 (Table 6) について大きな差異がみられなかった。Fig. 1 に示す電子顕微鏡像は、F 分画に膨潤 vesicle が比較的多く、P 分画は dense vesicle を多く含むことを示し、両分画に若干の差がみられた。処理 rMs、F 及び P 分画の像は成分分析の結果と対応していると考えられる。

Table 4 に示す処理 rMs の DG 含量は Table 1 の PL 分解量から計算した値の40%程度しかない。一方、PLase C は TC 処理で発現する M6Pase や G6Pase の全活性を阻害する (Table 2)。これらの機作の解明は重要な問題であり、詳細を検索中である。

## 摘 要

1. ラット肝粗面ミクロソームに phospholipase C を19℃で作用させ、この処理粗面ミクロソームをさらに 1.3 M sucrose の界面に浮遊する F 分画と沈澱する P 分画に細分画した。

2. 粗面ミクロソームの phospholipid は 2/3 ないし80%分解されたが、蛋白質と RNA の量には大きな変化がみられなかった。

3. ミクロソーム膜内層所在の mannose-6-phosphatase, glucose-6-phosphatase の、taurocholate 添加により発現する全活性は phospholipase C 処理により阻害された。同じく膜内層所在の  $\beta$ -glucuronidase は同様に阻害されたが、nucleoside diphosphatase は活性化された。

4. Phospholipid, RNA, cholesterol 及び phospholipase C の直接の反応生成物である diglyceride は F 分画及び P 分画の両方に分布した。処理粗面ミクロソーム中の diglyceride 存在量は phospholipid 分解量の40%であった。

5. 処理粗面ミクロソームの phospholipid では、phosphatidyl serine-phosphatidyl inositol 画分が最大の割合を占めた。F 分画と P 分画においても同様の結果であった。

6. Phospholipase C の作用によって electron dense vesicle と大きな膨潤した vesicle を生成し、F 分画には後者が比較的多く、P 分画は前者を比較的多く含んでいた。

## 謝辞

電子顕微鏡写真の撮影をおねがいのした日本電子KKに感謝します。



## 引用文献

- 1) Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) *Science*, 175, 720.
- 2) Finean, J. B. and Michell, R. H. (1981) *New Comprehensive Biochemistry*, Vol. 1 (Finean, J. B. and Michell, R. H., ed.) p. 1.
- 3) DePierre, J. W. and Ernster, L. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46, 201.
- 4) Sandermann, Jr., H. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 515, 209.
- 5) Op den Kamp, A. F. (1979) *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 47.
- 6) McIntosh, P. R., Clark, R. P. and Rabin, B. R. (1975) *FEBSLett.*, 60, 190 and 404.
- 7) Becker, J. F., Meehan, T. and Bartholomew, J. C. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 512, 136.
- 8) Pechey, D. T., Graham, A. B. and Wood, G. C. (1978) *Biochem. J.*, 175, 115.
- 9) 伊藤明夫(1974)生体膜実験法, 上 (赤松 稔他編, 共立出版KK) p. 268.
- 10) Schmidt, G. (1957) *Methods Enzymol.*, Vol. 3 (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., ed.) p. 447.
- 11) Schneider, W. C. (1957) *ibid.*, p. 680.
- 12) Allen, R. J. L. (1940) *Biochem. J.*, 34, 858.
- 13) Layne, E. (1957) *Methods Enzymol.*, Vol. 3 (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., ed.) p. 447.
- 14) Arion, W. J., Ballas, L. M., Lange, A. J. and Wallin, B. K. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 4901.
- 15) Fishman, W. H. and Bernfeld, P. (1955) *Methods Enzymol.*, Vol. 1 (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., ed.) p. 262.
- 16) Kuriyama, Y. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 2979.
- 17) O'Toole, K. (1975) *FEBSLett.*, 52, 180.
- 18) Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911.
- 19) Barron, E. J. and Hanahan, D. J. (1958) *J. Biol. Chem.*, 231, 493.
- 20) Renkonen, O. (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, 54, 361.
- 21) Courchaine, A. J., Miller, W. H. and Stein, Jr., D. B. (1959) *Clin. Chem.*, 5, 609.
- 22) Skipski, V. P. and Barclay, M. (1969) *Methods Enzymol.*, Vol. 14 (Lowenstein, J. M., ed.) p. 530.
- 23) Bartlett, G. R. (1959) *J. Biol. Chem.*, 234, 466.
- 24) 永野俊雄, 他(1975)電子顕微鏡生物試料作製法 (日本電子顕微鏡学会関東支部編, 丸善KK) p. 17.
- 25) Jothy, S., Tay, S. and Simpkins, H. (1973) *Biochem. J.*, 132, 637.
- 26) 大西俊一(1979)生体膜の構造と機能 (殿村雄治・佐藤 了編, KK講談社) p. 72.
- 27) Higgins, J. A. (1982) *J. Cell Science*, 53, 211.
- 28) Jain, M. K. (1980) *Introduction to Biological Membranes* (Jain, M. K. and Wagner, R. C., ed., John Wiley and Sons, Inc.) p. 87.
- 29) Coleman, R. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 300, 1.

## Summary

1. Rat liver rough microsomes were treated with phospholipase C at 19°C and the treated rough microsomes were subfractionated to F subfraction, floats on the interface of 1.3 M sucrose, and P subfraction, pellets at the bottom of the



centrifuge tube. These fractions were analyzed chemically, enzymatically, and electron microscopically.

2. Rough microsomal phospholipid was degraded about 80%. Amounts of protein and RNA did not change so largely.

3. Total activities, appeared in the presence of taurocholate, of the luminal mannose-6-phosphatase, glucose-6-phosphatase, and  $\beta$ -glucuronidase were inhibited considerably by phospholipase C treatment, but nucleoside diphosphatase activity was not.

4. Phospholipid, RNA, diglyceride, and cholesterol were distributed in both F subfraction and P subfraction. Amount of diglyceride present in the treated rough microsomes was only about 40% of the decrease of phospholipid phosphorus by phospholipase C.

5. Among phospholipid species in the treated rough microsomes phosphatidyl serine-phosphatidyl inositol fraction was the most. This feature was the same in both F subfraction and P subfraction.

6. Electron micrographs showed the formation of electron dense vesicles and large-swelling vesicles by the action of phospholipase C. Subfraction F was composed of these new vesicles preferentially and subfraction P contained more rough vesicles in addition. The morphological profiles agreed with the results of chemical analysis.